Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik C
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. L. Krüskemper

VITAMIN D_3 – METABOLISMUS IM MENSCHLICHEN KNOCHEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät Düsseldorf
vorgelegt von

ROSWITHA DURDEL

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0054

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik C
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H.L. Krüskemper

VITAMIN D_3 - METABOLISMUS IM MENSCHLICHEN KNOCHEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät Düsseldorf
vorgelegt von

ROSWITHA DURDEL

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. G. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. H.L. Krüskemper

Korreferent
gez.: Prof. Dr. W. Klein

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. H.L. Krüskemper für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit danken. Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Schweikert, Medizinische Poliklinik der Universität Bonn.

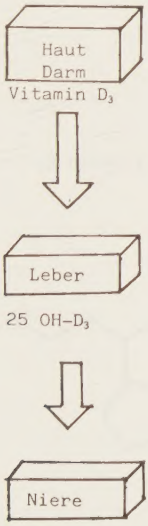
Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite 3
2.	Wirkung von Vitamin D_3	6
2.1.	Intestinum	6
2.2.	Niere	8
2.3.	Knochen	9
3.	Wirkung von Vitamin D-Metaboliten	12
3.1.	25- Hydroxycholecalciferol	12
3.2.	1,25- Dihydroxycholecalciferol	13
3.3.	24,25- Dihydroxycholecalciferol	15
3.4.	25,26- Dihydroxycholecalciferol	17
3.5.	1,24,25- Trihydroxycholecalciferol	18
3.6.	Vitamin D_2	19
3.7.	Dihydrotachysterol$_3$	20
4.	Vitamin D_3-bedingte Krankheitsbilder	22
4.1.	Rachitis	22
4.2.	Osteomalazie	23
4.3.	Osteoporose	23
4.4.	Primärer Hyperparathyreoidismus	24
5.	Material und Methoden	26
5.1.	Vorüberlegungen	26
5.2.	Inkubationssubstanzen	27
5.3.	Inkubationsmethode	30
6.	Ergebnisse der Spongiosainkubationen	32
6.1.	Versuchsgruppe I : Standardinkubation	32
6.2.	Versuchsgruppe II : Inkubation mit Urämikerserum	38
6.3.	Versuchsgruppe III: Inkubation mit NADH	39
7.	Diskussion	41
8.	Zusammenfassung	43
9.	Literatur	44

1. Einleitung

Das Vitamin D_3 ist ein fettlösliches Vitamin mit einer Steroidstruktur. Es kommt hauptsächlich in Milchprodukten und Eigelb vor. Mit Hilfe des Sonnenlichtes wird es in der Haut aus 7-Dehydrocholecalciferol, dem Provitamin D_3, synthetisiert und aus dem Dünndarm absorbiert. Im Anschluß daran wird das Vitamin D_3 zweifach hydroxyliert. Dabei entsteht zunächst in der Leber 25- Hydroxycholecalciferol (25 OH-D_3). Die zweite Hydroxylierung erfolgt in der Niere entweder zum 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25$(OH)_2$-D_3) oder zum 24,25- Dihydroxycholecalciferol (24,25$(OH)_2$-D_3). Kälte verhindert die Vitamin D_3-Synthese (1).

Abb. 1 : Vitamin D_3-Metabolismus



Nach Absorption im Intestinum oder Synthese in der Haut wird das Vitamin D_3 an ein Vitamin D-bindendes Protein gekoppelt und entweder sofort zur Leber transportiert, oder aber in den Fettdepots gespeichert. Im Intestinum selbst erfolgt keine Speicherung.

Abb. 2 : 7-Dehydrocholesterol oder Provitamin D_3

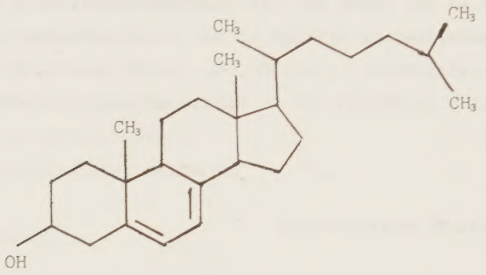
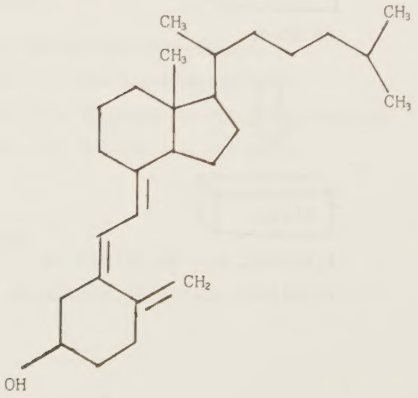


Abb. 3 : Cholecalciferol oder Vitamin D_3



Noch 1956 vermutete KODICEK, daß das Vitamin D_3 in der Leber gespeichert würde (2). Neuere Untersuchungen von ROSENSTREICH aus dem Jahre 1971 (3) widerlegten diese Auffassung. Seiner Meinung nach ist der langsame Fettstoffwechsel für das lange Verweilen des Vitamin D_3 im Körper verantwortlich. AVIOLI (4) gibt die Halbwertszeit für das in den Fettdepots gelagerte Vitamin D_3 mit Wochen bis Monaten an, während sie im Serum bei etwa 22 Stunden liegt.

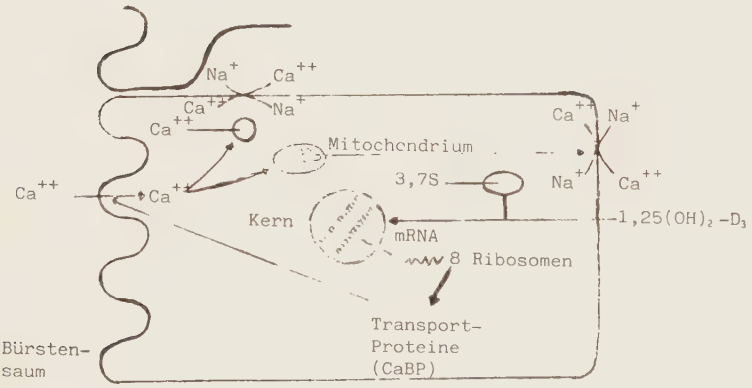
2. Wirkung von Vitamin D_3

2.1. Intestinum

Der aktive Metabolit des Vitamin D_3 , das $1,25(OH)_2-D_3$, ist verantwortlich für die aktive intestinale Calciumabsorption.

Bei einer Hypocalcämie werden die Nebenschilddrüsen zu einer vermehrten PTH-Sekretion stimuliert, das dann die 25 $OH-D_3$ -1,α-Hydroxylase in der Niere aktiviert. Ein Anstieg an $1,25(OH)_2-D_3$ bewirkt dann eine vermehrte Bildung von Calcium-bindendem Protein mit erhöhter intestinaler Calciumabsorption (Abb. 4).

Abb. 4 : Wirkung des $1,25(OH)_2-D_3$ auf den intestinalen Calciumtransport
(nach DE LUCA (5))



BAR und WASSERMANN (6) konnten zeigen, daß durch eine Umkehr der Serumverhältnisse, also bei einer Hypercalcämie, der gegenläufige Mechanismus abläuft, d.h. es erfolgt sowohl eine Verminderung der PTH-Sekretion,

die eine erniedrigte $1,25(OH)_2-D_3$ -Synthese zur Folge hat, als auch eine geringere Calciumabsorption aus dem Intestinum.

Das unspezifische Calcium-bindende Protein wurde von WASSERMANN und TAYLOR (7) aus der Mukosa von Vitamin D-reich ernährten Küken gewonnen. Das Molgewicht beträgt 24000. Pro Mol bindet es je zwei Mole Calcium mit hoher und zwei Mole mit geringerer Affinität.

Die Lokalisation des Calcium-bindenden Proteins in der Zelle bereitete erhebliche Schwierigkeiten.
Während WASSERMANN (8) annahm, es befände sich beim Küken in den intestinalen Becherzellen und auf den Microvilli, vertraten ARNOLD et al. (9) die Ansicht, daß das Calcium-bindende Protein bei Schweinen nicht in den Becherzellen, sondern hauptsächlich im Cytoplasma von absorptiven Zellen, ganz selten an deren Oberflächen, anzutreffen sei.

Neueste Untersuchungen von WILSON und LAWSON (10) aus dem Jahre 1977 ergaben nach Applikation von $1,25(OH)_2-D_3$ das Vorhandensein zweier verschiedener Calcium-bindender Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten von 44000 und 88000. Die Synthese des Proteins mit dem höheren Molgewicht fiel zeitlich mit dem erhöhten aktiven Calciumtransport zusammen. Eine endgültige Aussage darüber, ob es sich tatsächlich um das Transportprotein des Calcium handelt, ist noch nicht möglich.

Über das Verhalten des aktiven Vitamin D_3-Metaboliten in der Zelle stellte HAUSSLER (11) Untersuchungen bei Küken an. Er isolierte bei ihnen in Zellen von Intestinum, Nebenschilddrüse, Pankreas, Knochen und Hypophyse Cytosolrezeptoren.

Nach den heute geltenden Vorstellungen wird das $1,25(OH)_2-D_3$, gebunden an ein Plasmaprotein, zur intestinalen Zelle gebracht, in der es an ein 3,7 S Cytosoltransportprotein gebunden wird. Dieser Komplex tritt in den Zellkern ein und beeinflußt auf eine bisher unbekannte Weise spezifische

Genome, die die Kodierung für das Calcium- und Phosphattransportsystem tragen. Zwei bis drei Stunden nach Gabe von 0,27 µg $1,25(OH)_2-D_3$ konnte eine Erhöhung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II, die für die Synthese der Messenger-RNA verantwortlich ist, auf das Doppelte des Ausgangswertes beobachtet werden (12), und fünf bis neun Stunden nach $1,25(OH)_2-D_3$-Gabe waren die Ausgangswerte der Enzymaktivität wieder erreicht. Diese Befunde sind gut mit einem Effekt des $1,25(OH)_2-D_3$ auf die Synthese der Messenger-RNA vereinbar. Die für das Calcium-bindende Protein verantwortliche Messenger-RNA konnte isoliert und teilweise charakterisiert werden (13). Das Molgewicht beträgt etwa 700000 und ist damit größer als man für eine Messenger-RNA, die für die Synthese des Calcium-bindenden Proteins mit einem Molgewicht von 28000 verantwortlich ist, erwartet. Eine mögliche Erklärung wäre die Annahme, daß das Calcium-bindende Protein zunächst als ein größeres Molekül synthetisiert wird, von dem dann das aktive Calcium-bindende Protein abgespalten wird.

Da $1,25(OH)_2-D_3$, gebunden an spezifische Rezeptorproteine, im Kern angereichert wird, ist es sinnvoll anzunehmen, daß $1,25(OH)_2-D_3$ entweder die Synthese oder die Sekretion der Messenger-RNA in das Cytoplasma regelt.

Eine weitere Wirkung des Vitamin D besteht in der Beeinflussung des intestinalen Phosphattransportes (14). Bei der Aufnahme des Phosphat in die Zelle ist die Anwesenheit von Natrium erforderlich (15).

Bei nephrektomierten Tieren kann eine Stimulation der Phosphatabsorption durch 25 $OH-D_3$ nicht mehr erfolgen, da der aktive Metabolit nicht mehr gebildet werden kann. $1,25(OH)_2-D_3$ ist natürlich weiterhin aktiv (16).

2.2. Niere

Ähnlich zu den in den Dünndarmzellen befindlichen $1,25(OH)_2$-D-Trans-

portproteinen scheint es auch in der Niere einen spezifischen Rezeptor zu geben, der für den renalen Calcium- und Phosphatstoffwechsel mitverantwortlich ist.

Bei Hyperphosphatämie stimuliert das $1,25(OH)_2-D_3$ die renale Phosphatausscheidung (17). Der Mechanismus ist bisher unbekannt.
Für Calcium fand SUTTON (18) in seinen Untersuchungen heraus, daß Vitamin D ähnlich dem PTH mit an der renalen Calciumrückresorption beteiligt ist.

Bei einem zu niedrigen Calciumspiegel erfolgt eine durch erhöhtes PTH verursachte vermehrte $1,25(OH)_2-D_3$-Synthese , die eine erhöhte Calciumabsorption im Intestinum verursacht.
Bei normaler Serumkonzentration von $1,25(OH)_2-D_3$ wird bei niedrigem Serumcalcium die PTH-Sekretion stimuliert, und es erfolgt eine erhöhte renale Reabsorption von Calcium.
Handelt es sich nicht um eine akut eingetretene, sondern um eine chronische Hypocalcämie infolge einer negativen Calciumbilanz, dann bewirkt die erhöhte Synthese des $1,25(OH)_2-D_3$ langfristig eine Besserung der Calciumbilanz durch eine erhöhte intestinale Calciumabsorption.

2.3. Knochen

Neben Intestinum und Niere ist auch der Knochen ein Zielorgan des Vitamin D_3. NEVILLE et al. (19) applizierten rachitischen Ratten radioaktiv markiertes Vitamin D_3. Es wurde 48 Stunden nach Verabreichung noch zu 16 % der eingesetzten Dosis im Skelett nachgewiesen. Außerdem erfolgte eine Anreicherung der radioaktiven Substanz in den Mukosazellen des Intestinum, die zu 97 % aus $1,25(OH)_2-D_3$ bestand.
Radioaktivitätsnachweise am Knochen erfolgten bei Untersuchungen von WEZEMANN (20) nur an den Stellen, an denen auch eine aktive Minera-

lisation bestand, und zwar in den Osteoblasten und Osteocyten der Epi- und Metaphysen. Osteoklasten zeigten keine Radioaktivitätsanreicherungen. Das $1,25(OH)_2-D_3$ wird im Zellkern der Knochenzellen angereichert (21). Ob ein $1,25(OH)_2-D_3$-spezifisches Transportprotein in den Knochenzellen existiert, ist bisher unbekannt.

Für das im Cytosol der Knochenzellen angereicherte 25 OH-D_3 sind schon zwei spezifische Bindungsproteine beschrieben worden (22).
Über den Mechanismus der Vitamin D_3-Metabolitenaktivität im Knochen besteht noch keine Klarheit. Man weiß lediglich aus Untersuchungen von WONG (21), daß $1,25(OH)_2-D_3$ im Gegensatz zu 25 OH-D_3 in der Lage ist, bei nephrektomierten Ratten Calcium aus dem Knochen freizusetzen. Dabei ist ebenfalls das PTH beteiligt, das über eine Stimulation des cAMP die Mobilisation des Calcium bewirkt (23).

Über den Einfluß des Vitamin D_3 auf den Phosphatstoffwechsel im Knochen sind wenige Untersuchungen bekannt.
1975 fanden CASTILLO et al. (24) eine erhöhte Phosphatfreisetzung aus dem Knochen bei parathyreoidektomierten Ratten, denen $1,25(OH)_2-D_3$ verabreicht worden war.
RAISZ und NIEMANN erhielten 1969 (25) bei embryonalen Knochenkulturen auch eine vermehrte Phosphatresorption aus dem Knochen, die lediglich auf einer zuvor bestehenden niedrigen Serumphosphatkonzentration beruhte. Die Phosphatmobilisation aus dem Knochen ist nach diesen Ergebnissen vermutlich von der PTH-unabhängigen Wirkung des $1,25(OH)_2-D_3$ auf die Knochenresorption abhängig oder von einer niedrigen Phosphatkonzentration.

Nach Aufnahme von Calcium und Phosphat in die Knochenzelle erfolgt die Mineralisation, die, wie WUTHIER (25) vermutete, durch das Vitamin D geregelt wird.
Weitere Untersuchungen über eine Mitbeteiligung des Vitamin D an der Mineralisation führte BAYLINK (26) bei Patienten mit Rachitis und

EASTWOOD (27) bei chronisch Niereninsuffizienten mit gleichzeitiger Osteomalazie durch.
Erst RASMUSSEN und BORDIER (28) konnten einen klaren Beweis für die Abhängigkeit der Mineralisation des Knochens vom Vitamin D_3 erbringen. HAUSSLER (11) wies die für die Mineralisation benötigten Rezeptoren des $1,25(OH)_2-D_3$ in der Knochenzelle nach, und MALLUCHE (29) erhielt bei rachitischen Küken folgende Ergebnisse :
das $1,25(OH)_2-D_3$ dient hauptsächlich dem Erhalt der Knochenmasse und der Kontrolle des Längenwachstums, außerdem der Mineralisierung des gebildeten Osteoids; das $24,25(OH)_2-D_3$ unterstützt das $1,25(OH)_2-D_3$ in dessen Wirkungen, insbesondere, wenn das $1,25(OH)_2-D_3$ in niedriger Konzentration vorliegt.

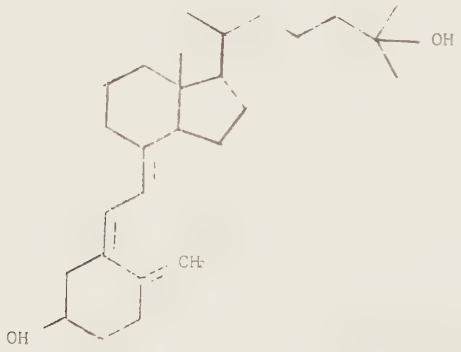
3. Wirkung von Vitamin D-Metaboliten

3.1. 25- Hydroxycholecalciferol (25 OH-D_3)

Das in der Leber hydroxylierte 25 OH-D_3 ist der Metabolit, der im Serum in höchster Konzentration vorliegt. Sie ist jedoch stark von der Jahreszeit und der geographischen Lage des Untersuchungsortes abhängig. Bei Messungen von KECK et al. (30) in Düsseldorf im Oktober 1979 ergaben sich Normwerte von 12,2 $\pm$ 5,9 ng/ml. Diese Werte liegen bedeutend niedriger als die aus den USA übermittelten von EISMAN (31) und ARNAUD (32), sind aber identisch mit den Werten von TAYLOR et al. (33) und KREMER et al. (34). Im April lagen die Normwerte (30) bei 3,3 $\pm$ 0,9 ng/ml. Bei hospitalisierten Patienten befanden sich die Werte für das 25 OH-D zwischen denen der Kontrollpersonen, nämlich bei 5,7 $\pm$ 2,9 ng/ml.

Außer den unterschiedlichen Jahreszeiten, zu denen diese Werte bestimmt wurden, spielt noch ein anderer Faktor eine nicht unerhebliche Rolle bei den niedrigeren Serumwerten für das 25 OH-D in Deutschland.

Abb. 5 : 25- Hydroxycholecalciferol



In den USA enthalten fast alle Nahrungsmittel Vitamin D_2, das bei der Bestimmung der Vitamin D-Metabolite ebenfalls erfaßt wird. Erst nach einer Trennung dieser beiden Vitamine - sie ist erst seit kurzem möglich (35) - könnte man die genaue Serumkonzentration für Vitamin D_3 bestimmen und somit vergleichbare Werte für das 25 OH-D aus den USA und Europa erhalten. Im Grunde ist das unnötig, da D_2 und D_3 ähnlich wirken.

In der Leber wird Cholecalciferol durch die Vitamin D_3-25-Hydroxylase in den Mikrosomen der Leberzellen unter Einfluß von NADPH, Sauerstoff und Magnesium an Position 25 der Seitenkette hydroxyliert (36). Hier erfolgt keine Speicherung, sondern das 25 OH-D_3 wird nach Kopplung an das Vitamin D-bindende Protein zur Niere transportiert, wo es weiter verstoffwechselt wird. Eine Speicherung findet anschließend in den Fettdepots statt.

Die Syntheserate des 25 OH-D_3 ist abhängig von der 25-Hydroxylase (37). Sie wir auf Grund hoher Konzentration an 25 OH-D_3 in der Leber gehemmt. Es besteht also eine Produkthemmung auf dem Leberniveau.

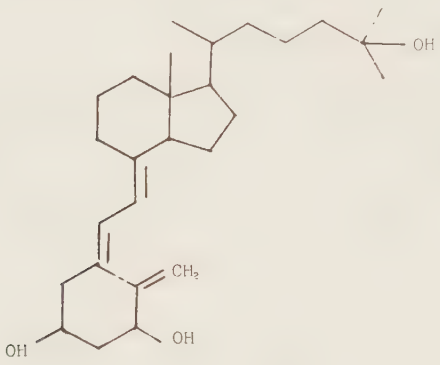
In physiologischen Konzentrationen ist das 25 OH-D_3 wenig aktiv, wohl aber wirkt es in pharmakologischer Dosierung. Der auch physiologisch aktive Vitamin D_3-Metabolit ist das in der Niere umgewandelte 1,25$(OH)_2$-D_3.

3.2. 1,25- Dihydroxycholecalciferol (1,25$(OH)_2$-D_3)

Der Normwert für das im Serum vorliegende 1,25$(OH)_2$-D lag im Oktober 1979 in Düsseldorf bei 25,8 $\pm$ 11,7 pg/ml bei Personen zwischen dem dritten und vierten Lebensjahrzehnt. Im Frühjahr betrug die durchschnittliche Serumkonzentration 38,3 $\pm$ 10,2 pg/ml. Weshalb die Werte bei hospitalisierten Patienten mit 53,3 $\pm$ 27,6 pg/ml wesentlich höher lagen, ist im Augenblick noch unklar (30).

Mit zunehmendem Alter erfolgt eine Abnahme der $1,25(OH)_2-D_3$-Synthese (38). Die Hydroxylierung erfolgt mit Hilfe der $25-OH-D_3-1-\alpha$-Hydroxylase, die sich in den renalen Mitochondrien befindet (39).

Abb. 6 : 1,25- Dihydroxycholecalciferol



Bei normaler Calciumkonzentration im Blut werden sowohl $1,25(OH)_2-D_3$, als auch $24,25(OH)_2-D_3$ in der Niere synthetisiert (40). Bei Calcium- und Phosphatbedarf steigt die Synthese des $1,25(OH)_2-D_3$, während bei einem Überangebot der beiden Elektrolyte die Produktion des $1,25(OH)_2-D_3$ gehemmt wird (41, 42).

Ähnlich der 25-Hydroxylierung in der Leber ist auch die Aktivität der $25-OH-D_3-1-\alpha$-Hydroxylase sowohl von NADPH als auch von Sauerstoff und Magnesium abhängig (43).

FRASER und KODICEK (44) veröffentlichten als Ergebnis ihrer Untersuchungen an Küken und Ratten, daß nur die Niere zur $1-\alpha$-Hydroxylierung fähig sei. Sie stützten ihre Aussage darauf, daß bei nephrektomierten

Ratten kein $1,25(OH)_2-D_3$ nachzuweisen war. Daß es im menschlichen Organismus wahrscheinlich noch einen anderen Ort der $1,25(OH)_2-D_3$-Synthese gibt, konnte in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden.

Die $1,25(OH)_2-D_3$-Synthese ist PTH-abhängig. Niedriges PTH und hoher Phosphatgehalt verursachen eine Inhibierung der $1,25(OH)_2-D_3$- bei gesteigerter $24,25(OH)_2-D_3$-Synthese bei Tieren, denen ausreichend Vitamin D zur Verfügung steht (45).

Es sind außerdem Untersuchungen bekannt, die sich mit dem Einfluß von Calcitonin, STH und Östrogenen auf die $1,25(OH)_2-D_3$-Synthese beschäftigen. Während die Stimulation durch Calcitonin sehr fraglich ist (46), bestehen bei STH (47) und Östrogenen (48) berechtigte Gründe zu der Annahme, daß diese Hormone einen stimulierenden Effekt auf die 1-α-Hydroxylase in der Niere ausüben, so daß ein Anstieg des $1,25(OH)_2-D_3$ im Serum resultiert.
Dies ist sehr wichtig bei einer Schwangerschaft, da durch erhöhte Östrogenspiegel vermehrt $1,25(OH)_2-D_3$ gebildet wird und somit ausreichend Calcium für den fetalen Knochenaufbau zur Verfügung steht.
Bei absinkendem Östrogenspiegel, z.B in der Postmenopause, beginnt nach einiger Zeit eine Entkalkung des Knochens, der zur Osteoporose führt.

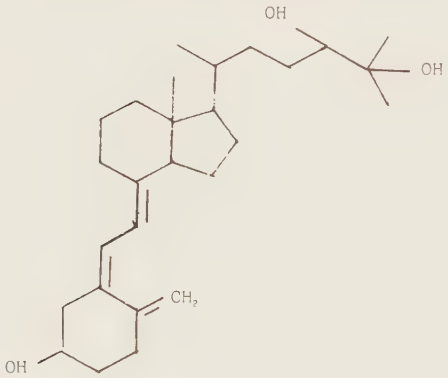
3.3. 24,25- Dihydroxycholecalciferol ($24,25(OH)_2-D_3$)

Ein anderes Hydroxylierungsprodukt des Vitamin D_3 in der Niere ist das $24,25(OH)_2-D_3$. Seine vermehrte renale Bildung wurde in Nierenhomogenaten von Küken beobachtet, denen eine Calcium- und Vitamin D-reiche Diät gefüttert worden war (49).

Ein fast völliger Verlust dieses Metaboliten bei nephrektomierten Ratten ließ BOYLE (50) vermuten, daß $24,25(OH)_2-D_3$ nur in der Niere synthetisiert werden kann.

In späteren Untersuchungen konnten jedoch GARABEDIAN (51) 1977 im Knorpel und KUMAR (52) 1978 im Intestinum von Tieren, sowie HORST (35) 1979 im Serum von Menschen nach Nephrektomie $24,25(OH)_2-D_3$ nachweisen. Wahrscheinlich ist auch die menschliche Spongiosa zur Synthese dieses Metaboliten fähig (53).

Abb. 7 : 24,25- Dihydroxycholecalciferol



Die zur Hydroxylierung des 25 OH-D_3 benötigte 24-Hydroxylase befindet sich ebenfalls in den Mitochondrien der Niere und ist NADPH-abhängig, so wie es schon bei der $1,25(OH)_2-D_3$-Synthese beschrieben wurde.

Messungen der Serumkonzentration des $24,25(OH)_2-D$ ergaben bei gesunden Personen in Düsseldorf Normwerte von $1,5 \pm 1,0$ ng/ml im Oktober und $0,17 \pm 0,04$ ng/ml im April, während sie bei hospitalisierten Patienten bei $0,64 \pm 0,44$ lagen (30).

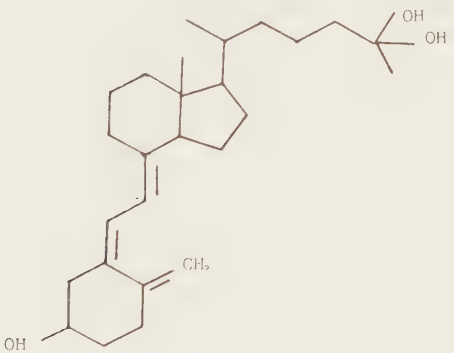
Untersuchungen nach einer einmonatigen Normalkost mit täglich 400 IU Vitamin D_3 ergaben einen Anstieg sowohl des 25 OH-D als auch des $24,25(OH)_2-D$, das $1,25(OH)_2-D$ lag dagegen im unteren Normbereich.

Eine Erniedrigung des 25 OH-D und des $24,25(OH)_2$-D im Serum ergaben die Untersuchungen an zwei Versuchspersonen, die über mehrere Monate hin Vitamin D-arm ernährt worden waren. Das $1,25(OH)_2$-D lag im Normbereich.

3.4. 25,26- Dihydroxycholecalciferol ($25,26(OH)_2$-D_3)

Ein weiterer Metabolit, das $25,26(OH)_2$-D_3, wird wahrscheinlich ebenfalls in der Niere gebildet (54). Es konnte sowohl beim Menschen (55), als auch bei Schweinen (56) im Serum nachgewiesen werden.

Abb. 8 : 25,26- Dihydroxycholecalciferol



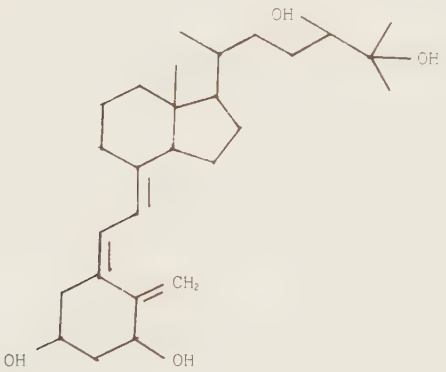
Über seine Bedeutung im menschlichen Organismus herrscht noch Unklarheit. THOMASSET (57) veröffentlichte 1979 Ergebnisse von Rattenexperimenten, bei denen das $25,26(OH)_2$-D_3 verantwortlich dafür war, daß das Calcium-bindende Protein im Intestinum und auch die Calciumfreisetzung aus dem Knochen stimuliert wurde.

3.5. 1,24,25- Trihydroxycholecalciferol ($1,24,25(OH)_3-D_3$)

Untersuchungen über Struktur und Wirkung der trihydroxylierten Metabolite des Vitamin D_3 stellte HOLICK an (58). Er entdeckte das $1,24,25(OH)_3-D_3$ bei rachitischen Küken, deren Nierenhomogenat mit $24,25(OH)_2-D_3$ inkubiert worden war.

Bei Vergleichen bezüglich der biologischen Aktivität zeigte sich das $1,24,25(OH)_3-D_3$ gegenüber dem $1,25(OH)_2-D_3$ als weniger aktiv; es besaß jedoch eine höhere Aktivität als das $24,25(OH)_2-D_3$.

Abb. 9 : 1,24,25- Trihydroxycholecalciferol



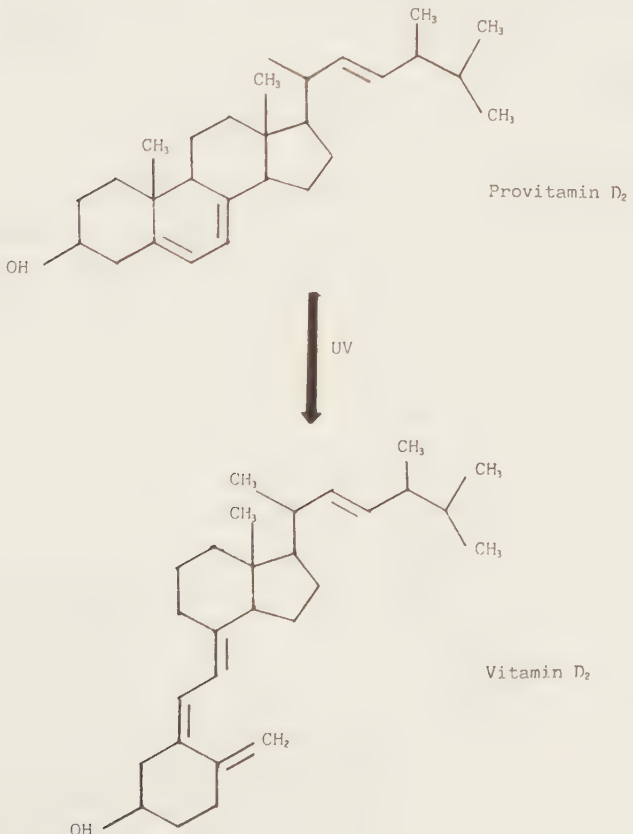
Das $1,24,25(OH)_3-D_3$ scheint einen erhöhten intestinalen Calciumtransport zu ermöglichen (58).
Außer der Niere als Metabolisierungsort des $1,24,25(OH)_3-D_3$ kommt wahrscheinlich noch das Intestinum als weiteres Syntheseorgan dieses Vitamin D_3-Abkömmlings in Frage, denn KUMAR et al. (52) wiesen bei nephrektomierten Ratten eine weitere Produktion des $1,24,25(OH)_3-D_3$ nach.

Ob auch die menschliche Spongiosa zu einer $1,24,25(OH)_3-D_3$-Metabolisierung in der Lage ist, konnte in der hier vorliegenden Arbeit noch nicht geklärt werden.

3.6. Vitamin D_2 (Ergocalciferol)

Das Vitamin D_2, auch Ergosterol genannt, entsteht in Pflanzen unter UV-Einfluß aus dem Provitamin D_2.

Abb. 10 : Umwandlung des Provitamin D_2 zu Vitamin D_2



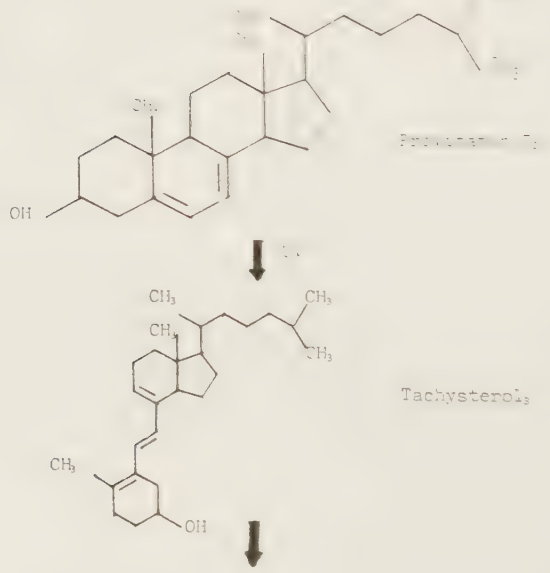
Die sich anschließende Metabolisierung des Vitamin D_2 erfolgt ähnlich der des Vitamin D_3 (59), sogar die Hydroxylasen sind identisch (60

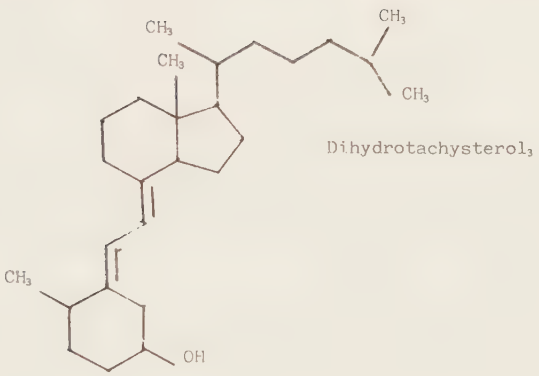
Die biologische Aktivität lag jedoch im Vergleich zu den Vitamin D_3-Metaboliten 25 OH-D_3 und 1,25(OH)$_2$-D_3 weit niedriger (61

3.7. Dihydrotachysterol$_3$ (DHT_3, AT-10)

Das Dihydrotachysterol$_3$, auch DHT_3 oder AT-10 genannt, wird aus dem Pro-vitamin D_3, dem 7-Dehydrocholesterol, gebildet. Unter UV-Einfluß entsteht über die Zwischenstufe des Tachysterol$_3$ das Dihydrotachysterol$_3$.

Abb. 11 : Umwandlung des Provitamin D_3 zu Dihydrotachysterol$_3$





Dihydrotachysterol$_3$

Es handelt sich um ein Reduktionsprodukt des Provitamin D_3 , das als Therapeutikum der Hypocalcämie beim Hypoparathyreoidismus von großer Bedeutung ist (62).

Das 1970 von SUDA et al. (63) synthetisierte 25-Hydroxydihydrotachysterol$_3$ zeigte eine positive Wirkung auf die ossäre Calciummobilisierung.

Als antirachitisches Therapeutikum ist das DHT_3 jedoch ineffektiv, da die Mineralisationswirkung im Verhältnis zum Vitamin D_3 quantitativ zu gering ist (63).

4. Vitamin D_3-bedingte Krankheitsbilder

4.1. Rachitis

Die wohl bekannteste Krankheit bei einem Vitamin D_3-Mangel ist die bei Kindern zwischen dem sechsten Lebensmonat und dritten Lebensjahr beobachtete Rachitis.
Sie entsteht durch einen Mangel an UV-Strahlen, mit deren Hilfe das in der Epidermis gespeicherte 7-Dehydrocholesterin zu Vitamin D_3 umgewandelt wird. Der weitere Umbau des Vitamin D_3, insbesondere die Hydroxylierung zu dem aktivsten Metaboliten - dem $1,25(OH)_2$-D_3 - unterbleibt, so daß die Calciumabsorption stark erniedrigt ist. Die hieraus resultierende Hypocalcämie verursacht eine Gegenregulation seitens der Nebenschilddrüse - es entsteht ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Dabei wird Calcium aus dem Knochen mobilisiert und im proximalen Tubulus rückresorbiert, die Phosphatrückresorption wird gehemmt.
Die im Urin von rachitischen Kindern zu findenden Elektrolytverschiebungen sind typisch für dieses Krankheitsbild. Die Mineralisation von gebildetem Osteoid unterbleibt wegen des Vitamin D-Mangels.

Rachitisgefährdet sind besonders schnell wachsende Kinder, d.h. auch Frühgeburten. Da der Schädel in den ersten Lebensmonaten die größte Wachstumsgeschwindigkeit aufweist, zeigen sich hier auch die frühesten Veränderungen, die Kraniotabes.

Weitere Skelettsymptome sind der rachitische Rosenkranz an den Knochen-Knorpelgrenzen der Rippen, Sitzbuckel, doppelseitige Coxae varae und Tibiae varae, sowie durch die verminderte Festigkeit des Knochens bedingte Spontanfrakturen.
Vermeiden läßt sich diese Vitaminmangelkrankheit durch eine ausreichende Rachitisprophylaxe im ersten Lebensjahr, die in einer Dosierung von 500-1000 IE Vitamin D_3 pro Tag besteht.

4.2. Osteomalazie

Die bei Erwachsenen auftretende Rachitis, Osteomalazie genannt, kommt hauptsächlich während der Schwangerschaft und Stillperiode vor, aber auch als Folge eines Malabsorptionssyndroms und bei türkischen Gastarbeitern in Deutschland.

Die Osteomalazie äußert sich in Knochenschmerzen und Muskelschwäche, so daß man leicht rheumatische Ursachen vermuten könnte.
Als Auffälligkeiten bei den Laborwerten gelten erniedrigte oder niedrig normale Calcium- und Phosphatwerte und eine erhöhte alkalische Phosphatase.
Bei der Therapie verfährt man ähnlich der Rachitis, indem man Vitamin D_3 appliziert.

4.3. Osteoporose

Nach unserer heutigen Auffassung über Ursache und Ausmaß der Osteoporose scheinen vier Faktoren ausschlaggebend zu sein.

Maßgebend ist die während der ersten dreißig Lebensjahre erworbene Knochenmasse - bei Männern ist sie normalerweise größer als bei Frauen.
Zum zweiten scheint der abfallende Östrogengehalt die bei Frauen in der Postmenopause auftretende Osteoporose zu verursachen.
Zwei weitere Faktoren, die bei Männern und Frauen gleichermaßen in Erscheinung treten und den Knochenbau beeinflussen, sind die mit zunehmendem Alter verminderte Calciumabsorptionsfähigkeit des Dünndarms und die verringerte Anzahl an Knochenzellen.

Es gibt verschiedene Formen der Osteoporose. Dabei ist die der Postmenopause besonders eng mit dem Vitamin D-Stoffwechsel verbunden.
Ein Vergleich zwischen Frauen in der Postmenopause mit gleichzeitig

existierender Osteoporose und gleichaltrigen gesunden Frauen ist in einer Untersuchung von J.C.GALLAGHER et al. (64) dokumentiert:

Im Serum beider Gruppen liegen die Werte für das 25 OH-D_3 im Normbereich, es herrscht also ein ausreichendes Angebot an Vitamin D_3 für den Körper vor. Die Werte für das aktive, die Calciumabsorption beeinflussende $1,25(OH)_2$-D_3 liegen bei Gesunden höher als bei den Postmenopausefrauen. Ob anstelle des aktiven $1,25(OH)_2$-D_3 vermehrt inaktive Vitamin D_3-Metabolite gebildet werden, oder ob der Grund in einer Schädigung der 1-α-Hydroxylase zu suchen ist, ist noch unklar.

DE LUCA et al. (65, 66) erhielt bei Messungen von $1,25(OH)_2$-D_3 bei Osteoporotikerinnen in der Postmenopause nach 6-monatiger Östrogenbehandlung einen signifikanten Anstieg des $1,25(OH)_2$-D_3 und des absorbierten Calcium im Serum.

Es ist also möglich, daß die 1-α-Hydroxylase durch Östrogene stimuliert wird und daß eine Hemmung bei einem Östrogenmangelzustand eintritt.

4.4. Primärer Hyperparathyreoidismus

MAWER et al. (67) und STANBURY et al. (68) untersuchten die Serumkonzentrationen von $1,25(OH)_2$-D_3 bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus. Sie stellten nach einer Bolusinjektion von 10 µg (1,2-^{3}H,4 ^{14}C-) Cholecalciferol fest, daß das $1,25(OH)_2$-D_3 trotz eines erhöhten Serumcalcium von 3,18 mmol/l in gleicher Konzentration im Blut vorhanden war wie bei Normalpersonen.
In ähnlicher Weise verhielt sich das $24,25(OH)_2$-D_3 bei hyperparathyreoten Patienten. Bei gesunden Kontrollgruppen wurde schon bei einem Serumcalcium oberhalb von 2,4 mmol/l kein $1,25(OH)_2$-D_3 mehr gebildet.

Wahrscheinlich herrscht beim primären Hyperparathyreoidismus ein erhöh-

tes renales turnover des 25 OH-D_3 vor, denn sowohl 1,25$(OH)_2$-D_3 als auch 24,25$(OH)_2$-D_3 waren nach der Bolusinjektion von 10 µg (1,2-^{3}H, 4 ^{14}C-) Cholecalciferol bei den erkrankten Patienten im Serum zu finden - im Gegensatz zu Normalpersonen, bei denen nach einer Bolusinjektion entweder nur der eine oder nur der andere Metabolit verstärkt synthetisiert wurde.

5. Material und Methoden

5.1. Vorüberlegungen

Über den Metabolismus des 25 OH-D_3 im menschlichen Knochen ist bisher nichts bekannt.
BARBEIAN et al. wiesen die Bildung von 24,25$(OH)_2$-D_3 in Knochenzellen nach (39), das mit der von LUBEN et al. (7o) erarbeiteten Technik aus Mäuseschädeln isoliert worden war.
MALLUCHE et al. (29) wiesen in ihren Untersuchungen bei Vitamin D_3-arm ernährten Küken darauf hin, daß beide Metabolite, nämlich das 24,25$(OH)_2$-D_3 und auch das 1,25$(OH)_2$-D_3 für den Knochenstoffwechsel unentbehrlich sind.

Da Metabolite des Vitamin D_3 auch für den menschlichen Knochenstoffwechsel von ausschlaggebender Bedeutung sind, wurde der Vermutung nachgegangen, ob nicht auch der Knochen in der Lage ist, selbst die von ihm benötigten aktiven Formen des Vitamin D_3 herzustellen. Verstärkend wirkte noch die Tatsache, daß ja bekanntlich nicht alle Patienten mit renaler Insuffizienz eine urämische Osteopathie entwickeln. Der Grund dafür könnte in der Fähigkeit des Knochens zur Selbstversorgung mit den benötigten Metaboliten liegen.

Zur Klärung dieser Fragen bezüglich einer Metabolisierung des Vitamin D_3 durch den Knochen wurde menschliche Spongiosa gewählt.
Sie besitzt auf ihrer Oberfläche Osteoklasten und Osteoblasten, also Zellen mit biologischer Aktivität. Durch Zerkleinern einer nicht zu großen Menge Spongiosa - 500 mg/2 ml Inkubationsmedium - wurde die freie Oberfläche der aktiven Zellen vergrößert, so daß möglichst viele von ihnen mit dem zugefügten radioaktiv markierten Metaboliten 25 OH-D_3* in Kontakt kommen konnten.
Da Rattenknochen im Vergleich zu menschlichem Knochen viel weniger Spongiosa enthalten, wurden die Untersuchungen an Spongiosa von menschlichen Hüftköpfen durchgeführt.

5.2. Inkubationssubstanzen

Bei den zur Inkubation benötigten Radioaktivitäten handelt es sich um tritiummarkierte Substanzen:
(1,2-^{3}H(N))-Vitamin D_3 (Lot. Nr. 998-180) von der Firma New England Nuclear;
25- Hydroxy-(23,24(n)-^{3}H)cholecalciferol (25 OH-D_3 *) (Code TRK. 558, Batch 8) und
24,25- Dihydroxy-(23,24(n)-^{3}H)cholecalciferol (24,25$(OH)_2$-D_3 *) (Code TRK. 616, Batch BA 1) und
1,25- Dihydroxy-(23,24(n)-^{3}H)cholecalciferol (1,25$(OH)_2$-D_3 *) (Code TRK. 588, Batch A 8) von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig.

24,25$(OH)_2$-D_3 * und 1,25$(OH)_2$-D_3 * wurden durch Inkubation mit 25 OH-D_3 * und einem Homogenat aus Kükennieren hergestellt.

Bevor die oben aufgeführten Substanzen bei den Spongiosainkubationen eingesetzt wurden, wurden sie über zwei Säulensysteme gereinigt. Auf diese Weise wurden auch noch die in geringer Menge vorhandenen polaren und unpolaren Verunreinigungen eliminiert, so daß mit reinem 25 OH-D_3 * inkubiert werden konnte.

Der erste Schritt dieser Reinigung bestand in einer Chromatographie über eine LH 20-Säule (Sephadex LH 20, Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) (Abbildung 12).
Die Säule hatte eine Länge von 50 cm bei einem Durchmesser von 1,5 cm. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus n-Hexan/Chloroform/Methanol 9:1:1 (v/v/v) (Merck, Darmstadt). Ein Aliquot der in einem Fraktionssammler aufgefangenen Eluate von je 0,5 ml wurden in einem Szintillationszähler gemessen, anschließend wurden die Fraktionen des Produktpeaks zusammengespült und unter Stickstoff zur Trockene eingedampft.

Abb. 12 : Reinigung von 25 OH-D_3 * auf einer 50 cm langen LH 20-Säule

Der zweite Reinigungsschritt erfolgte über eine High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC, Laboratory Data Control, Florida, USA).

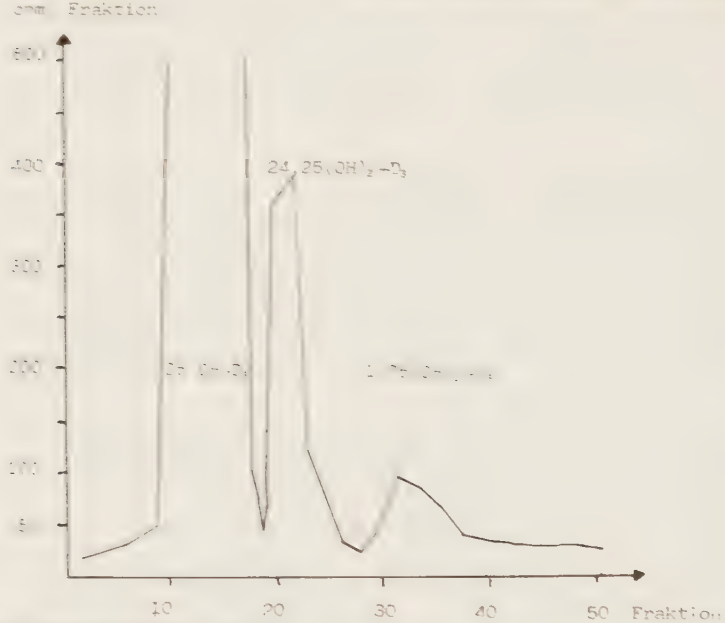
Die Säule hatte als Trennsubstanz LiChrosorb SI 100, 10 µ (Merck, Darmstadt). Als Laufmittel diente Dichlormethan/Methanol 98:2 (v/v). Über diese Säule wurde nun das zuvor über die LH 2o-Säule gereinigte 25 OH-D_3 * geschickt. Die Flußgeschwindigkeit der HPLC betrug 1 ml/min. bei einem Druck von 360 psi. Die wiederum in einem Fraktionssammler zu je 0,5 ml aufgefangenen Eluate ermöglichten eine nochmalige Trennung

des Produktpeaks von Verunreinigungen.

Der aus den Fraktionen 9-11 bestehende Peak wurde zusammengespült, unter Stickstoff zur Trockene eingedampft und bei -20° C bis zur Inkubation aufbewahrt.

Für die Herstellung des 24,25$(OH)_2$-D_3* wurden weiße weibliche Leghornküken vier Wochen lang mit einer Vitamin D-reichen Diät ernährt. Nach dieser Zeit wurden die Küken durch Dekapitation getötet, und es wurden ihnen beide Nieren entnommen. Sie wurden sofort in kalten Homogenatpuffer gegeben, der aus 0,05 m Tris-HCl (pH 7,5 bei 25° C), 0,0019 m MgCl x 6 H_2O, 0,005 m Natriumsuccinat und 0,2 m Saccharose (pH 7,1 bei 37° C) bestand.
Nach Entfernen von den Nieren anhängendem Gewebe und Blutgefäßen, erfolgte die Homogenisation der beiden Nieren in 10 ml Homogenatpuffer mit einem Ultra-Turax unter Kühlung (13 strokes von je 5 sec. Länge). 1 µCi 25- Hydroxy(23,24 (n)-^{3}H)cholecalciferol wurde mit 15 ml des Homogenats 30 min. bei 37° C im Wasserschüttelbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 45 ml eines Gemisches aus Methanol/Chloroform 1:2 (v/v) gestoppt. Nach Zentrifugation wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase erneut mit 15 ml Chloroform (destilliert mit 0,05 % butyliertem Hydroxytoluol) extrahiert. Beide organischen Phasen wurden vereinigt und mit bidestilliertem Wasser (pH 7,0) gewaschen, zur besseren Trennung zentrifugiert und die organische Phase mit Calciumchlorid getrocknet. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und unter Lichtschutz im Kühlschrank bei -4° C unter Stickstoff aufbewahrt. Abbildung 13 zeigt das Elutionsprofil des Nierenhomogenatextraktes auf einer HPLC.
Die Identifizierung der beiden Metabolite 24,25$(OH)_2$-D_3^* und 1,25$(OH)_2$-D_3^* erfolgte nach STANBURY und MAWER (71).

Abb. 13: Elutionsprofil des Nierenhomogenatextraktes auf einer HPLC



Nach einigen Monaten entfiel die Aufzucht der Küken, da mittlerweile das 24,25$(OH)_2$-D_3* ebenso wie das 1,25$(OH)_2$-D_3* bei der Firma Amersham Buchler, Braunschweig, käuflich zu erwerben war.

Die Elutionspunkte der einzelnen Vitamin D-Metabolite konnten mit Hilfe der biosynthetisierten oder käuflich erworbenen, markierten Vitamin D-Metabolite auf der LH 20-Säule und der HPLC festgelegt werden.

5.3. Inkubationsmethode

Die Femurköpfe Spongiosa stammte von Patienten des Petrushospitals in Bonn. Dreißig Männer und Frauen im Alter zwischen 59 und 76 Jahren unterzogen sich zwischen April 1978 und Juli 1979 wegen einer Coxarthrose bzw. einer Hüftkopfnekrose einer Totalendoprothesenoperation.

Der dabei entfernte Hüftkopf kam direkt in kalte, sterile 0,9%-ige physiologische NaCl-Lösung. Unter sterilen Bedingungen erfolgte das Herauskratzen der Spongiosa mit Hilfe eines Spatels. Sie wurde zerkleinert und immer wieder mit kalter, steriler NaCl-Lösung gewaschen. Wenn durch das ständige Spülen schließlich keine Blut- oder Knochenmarkszellen mehr innerhalb der Spongiosa enthalten waren, wurde die benötigte Spongiosamenge von 500 mg abgewogen und in die vorbereiteten Glasröhrchen gefüllt. Die histologische Untersuchung durch einen Pathologen ergab neben Knochenzellen nur noch vereinzelte Bindegewebszellen.
Das Inkubationsmedium setzte sich folgendermaßen zusammen :

1,67 nmol 25 OH-D_3*, 1 mmol NADPH, 200 IE Penicillin G,
80 µg Gentamycin, 2 ml EMM (Eagles medium minimum)

Unter Carbogenatmosphäre (95% O_2 und 5% CO_2) wurden die Röhrchen bei einer Temperatur von 37° C drei Stunden im Wasserschüttelbad inkubiert.

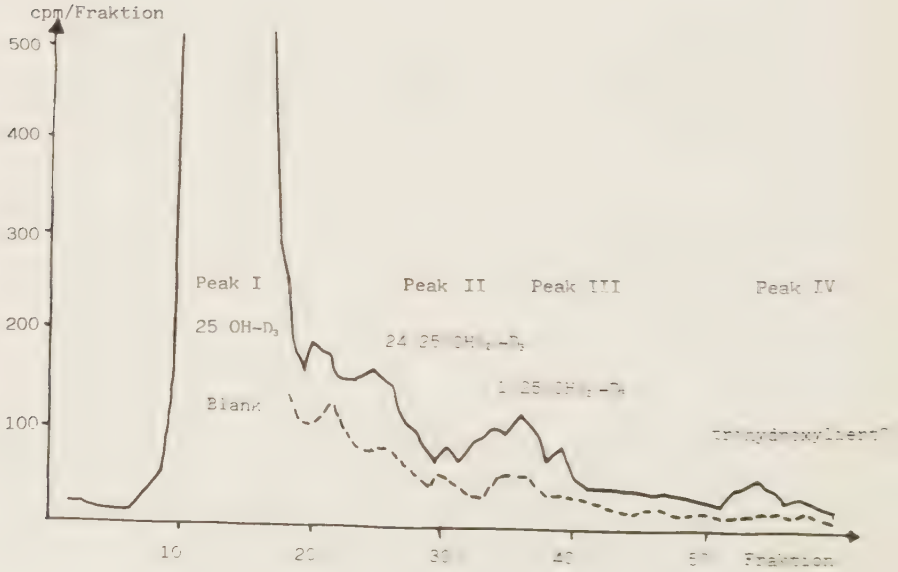
Die Reaktion wurde mit 10 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) gestoppt und unter Stickstoffatmosphäre bis zur Extraktion auf Eis gesetzt. Nach der Extraktion der Unterphase erfolgte das bis zur Trockene Eindampfen unter Stickstoff und das Einfrieren bei -20° C bis zur weiteren Verarbeitung.

6. Ergebnisse der Spongiosainkubationen

6.1. Versuchsgruppe I: Standardinkubation

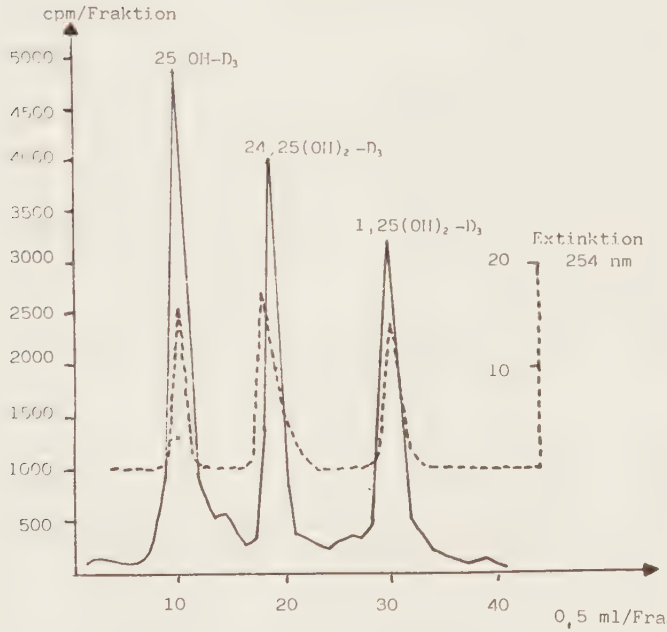
Die nach Inkubation gefundene Gesamtaktivität in den Extrakten lag bei ca. 60% des eingesetzten 25 OH-D_3*. Nach Auflösen im Laufmittel wurden die dunkel und kühl gelagerten Extrakte über die HPLC gegeben. Dabei wurde ein Elutionsprofil erhalten, das vier Produktpeaks zeigte. Sie wurden mit Peak I, II, III und IV bezeichnet.
Abbildung 14 stellt graphisch die erhaltenen Aktivitätsmuster dar.

Abb. 14: Vitamin D_3-Metabolite nach Spongiosainkubation von 25 OH-D_3 auf der HPLC



Das Elutionsprofil der markierten und unmarkierten Vitamin D_3-Metabolite zeigt Abbildung 15.

Abb. 15: Elutionsprofil markierter und unmarkierter Vitamin D_3-Metabolite auf einer HPLC



Hierbei erscheinen die käuflich erworbenen Metabolite 25 OH-D_3 * in den Fraktionen 9-11, 24,25 $(OH)_2$-D_3 * in den Fraktionen 18-20 und 1,25$(OH)_2$-D_3 * in den Fraktionen 29-31.
Eine parallel laufende photometrische Messung im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigte für die unmarkierten Metabolite Extinktionsmaxima in den gleichen Fraktionsröhrchen, wie sie auch bei den radioaktiv markierten Metaboliten anzutreffen waren.

Ein Vergleich zwischen den beiden Kurven der Abbildungen 14 und 15 ließ

folgende Zuordnung zu:

Peak I aus Abbildung 14 entspricht dem eingesetzten 25 OH-D_3 *.

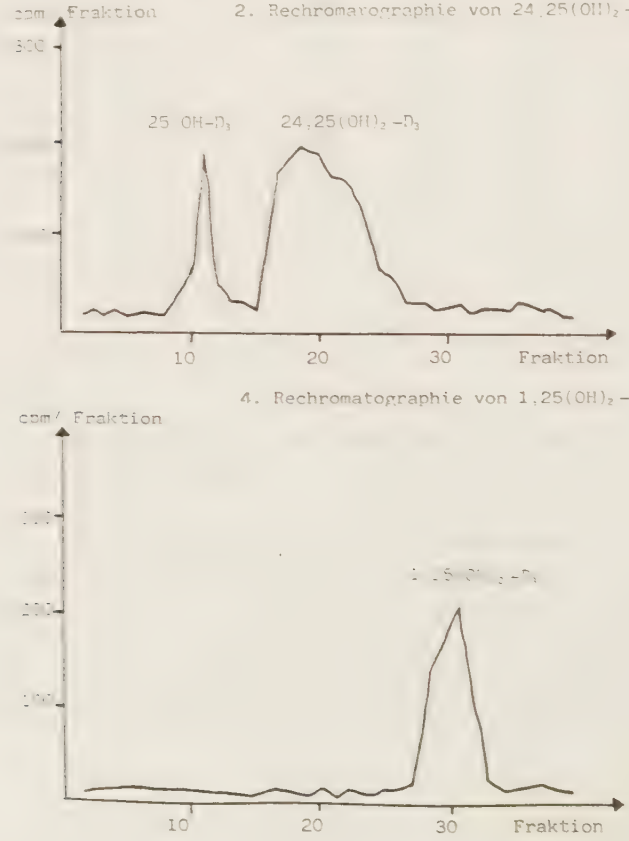
Peak II war zweigipflig und wurde zur Rechromatographie erneut zusammengesammelt

Peak III wurde ebenfalls rechromatographiert

Peak IV wurde gesammelt

Die Rechromatogramme der Peaks II und III nach zwei- bzw. viermaliger Säulenchromatographie zeigt Abbildung 16.

Abb. 16: Rechromatographie von Peak II und III



Das Radioaktivitätsmaximum von Peak II nach zweimaliger Rechromatographie lag in den gleichen Fraktionen wie in den zuvor durchgeführten UV-Messungen der unmarkierten Vergleichssubstanzen 25 OH-D_3, 24,25$(OH)_2$-D_3 und 1,25$(OH)_2$-D_3. Der Vorpeak spricht seiner Lage nach für eine Restaktivität des eingesetzten 25 OH-D_3*, nämlich mit einem Maximum bei Fraktion 11, während dagegen der Hauptpeak II die höchste Radioaktivität an gleicher Stelle zeigt wie das käufliche und biosynthetisch hergestellte 24,25$(OH)_2$-D_3*.

Weitere Hinweise zu der Annahme, daß es sich bei Peak II um den 24,25$(OH)_2$-D_3-Metaboliten handelt, zeigten erneute Cochromatographien mit gekauftem 24,25$(OH)_2$-D_3* auf einer LH 20-Säule und einer HPLC (Aufbau und Laufmittel wurden oben beschrieben). Beide Cochromatographien zeigten nur einen Aktivitätsgipfel.

Für Peak III wurden vier Rechromatographien auf der HPLC durchgeführt. Es ergab sich ein Aktivitätsmaximum bei Fraktion 30, also an der gleichen Stelle, an der auch das 1,25$(OH)_2$-D_3* in Abbildung 15 seinen Gipfel hatte.

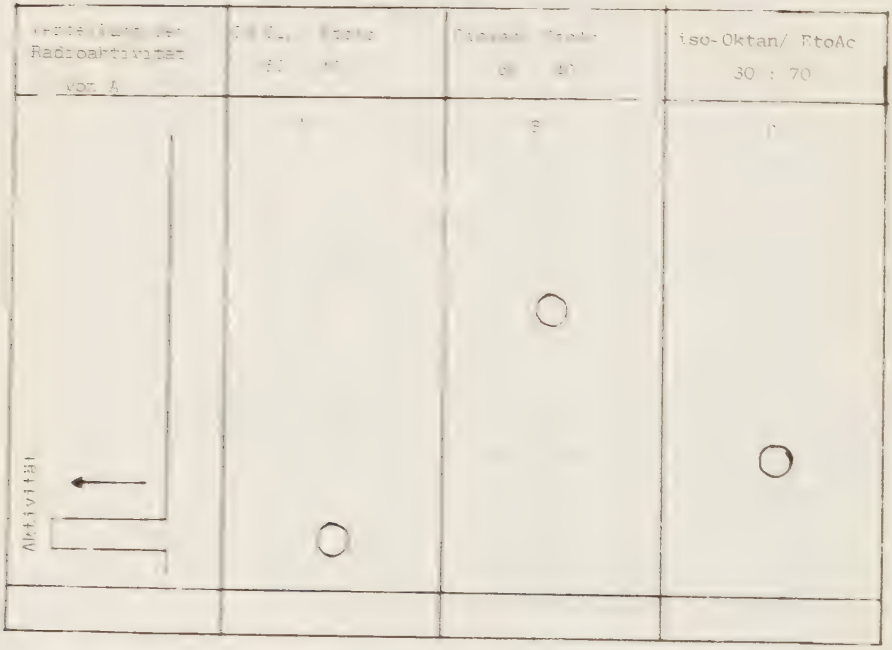
Zur weiteren Identifizierung von Peak III wurden Dünnschichtchromatographien durchgeführt (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F_{254}, Merck, Darmstadt). Als Laufmittel wurden drei Systeme unterschiedlicher Polarität benutzt:

1) Dichlormethan/Essigsäureäthylester 60:40 (v/v)
2) iso - Octan /Essigsäureäthylester 30:70 (v/v)
3) Dioxan /Essigsäureäthylester 60:40 (v/v)

Die DC-Platten wurden in drei Bahnen unterteilt und auf jeden Startpunkt eine andere Substanz, entweder unmarkiertes 1,25$(OH)_2$-D_3, markiertes 1,25$(OH)_2$-D_3* oder ein Aliquot des Peak III aufgetragen. Die Ergebnisse der DC zeigt Abbildung 17. Im UV-Licht wurde der vom Startpunkt fortgewanderte UV-aktive Bereich umrandet und parallel dazu aus den beiden übrigen Bahnen auf gleicher Höhe das Kieselgel abge-

Streifen und nach Eluieren die Radioaktivität gezählt. Hierbei verwandelte sich, wie vorauszusehen, auch hier wieder ein gleich großer Bereich der Dünnschichtplatte zur Messung des Untergrundes.

Abb. 17: Dünnschichtchromatographie des Peak III in drei verschiedenen Laufmitteln (EtoAc = Essigsäureäthylester)



Zur weiteren Kontrolle wurde das kalte 1,25$(OH)_2$-D_3 auf dieselbe Stelle wie das heiße 1,25 $(OH)_2$-D_3 * aufgetragen, dann wurde der UV-aktive Bereich abgetrennt und in ihm die Radioaktivität gezählt. Dann wurden im Verlauf der Laufstrecke gleiche Streifen ausgeschnitten und ebenfalls gezählt. Nur der Streifen, der auch UV-aktiv war, enthielt die Radioak-

tivität.

Außerdem wurden von Peak III Acetate hergestellt (Pyridin/Essigsäureanhydrid/Dunkelheit/24 Stunden). Ihre Chromatographie in den oben erwähnten drei Laufmitteln verlief analog den Acetaten, die mit dem gekauften $1,25(OH)_2-D_3$ * hergestellt wurden. Dabei zeigten sich im UV-Licht noch drei weitere Substanzflecke, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Vielleicht handelt es sich dabei um Mono- und Diacetate des $1,25(OH)_2-D_3$ *.

Ein letzter Schritt zur Identifizierung des aktivsten Vitamin D_3-Metaboliten bestand in einer Kristallisation zur konstanten, spezifischen Aktivität. Für die Durchführung der Kristallisation sei Herrn Dr. W. Meier und Frau Ulrike Hennes, Hoffmann - La Roche AG, Basel, gedankt.

Das Ergebnis der Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität von Peak III zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Kristallisation des Peak III mit $1,25(OH)_2-D_3$ zur konstanten spezifischen Aktivität

	Menge in mg	Messmenge in mg	Aktivität in cpm		
			pro mg	total	Messverlust
K_1	14,0	1,215	570	7980	692
M_1	14,5	1,450	600	8700	870
				16680	
K_2	8,0	0,410	639	5100	262
M_2	4,785	0,957	132	600	132
				5700	
K_3	5,4	1,045	565	3051	590
M_3	2,19	0,657	64	140	42
				3191	

Die Kristallisation K_1 erfolgte aus Methylformiat, die von K_2 und K_3 durch Zusatz von n-Hexan bei -10 bis -20° C. Die Kristallisate wurden vor Beginn der Messung bei 0,01 Torr/20° C 15 bis 20 min getrocknet. Die spezifische Aktivität beträgt in K_1 570 cpm/mg, in K_2 639 cpm/mg und in K_3 565 cpm/mg.

Die Identifizierung von Peak IV steht noch aus. Da er sich auf der RPLC polarer als die übrigen Peaks verhält, könnte es sich eventuell um das $1,24,25(OH)_3$-D_3*, einem anderen Metaboliten des Vitamin D, handeln.

6.2. Versuchsgruppe II : Inkubation mit Urämikerserum

Die Ergebnisse der Spongiosainkubationen, denen zusätzlich 1 ml Urämikerserum zugesetzt wurde, unterschieden sich von denen mit Poolserum. Während bei den letzteren die schon in Versuchsgruppe I erhaltenen Metabolite auftraten, verliefen die Chromatographien der Urämikerseruminkubationen ähnlich den Kontrollen, d.h. es war außer den eingesetzten 25 OH-D_3* kein weiterer Metabolit des Vitamin D_3 zu finden (Abbildungen 18 und 19).

Abb. 18 : Spongiosainkubation mit 1 ml Poolserum

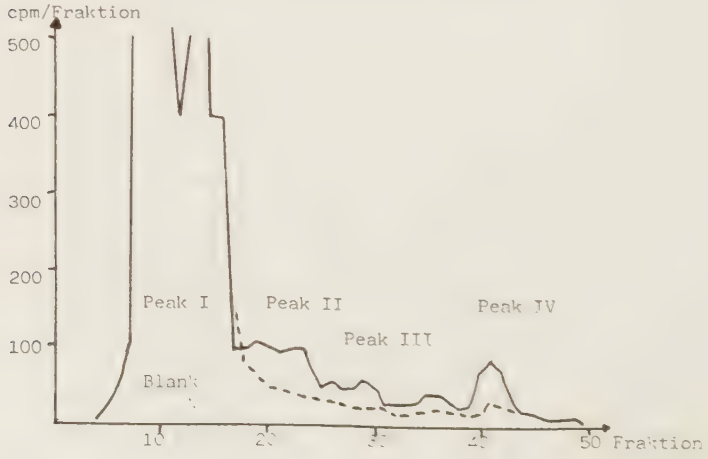
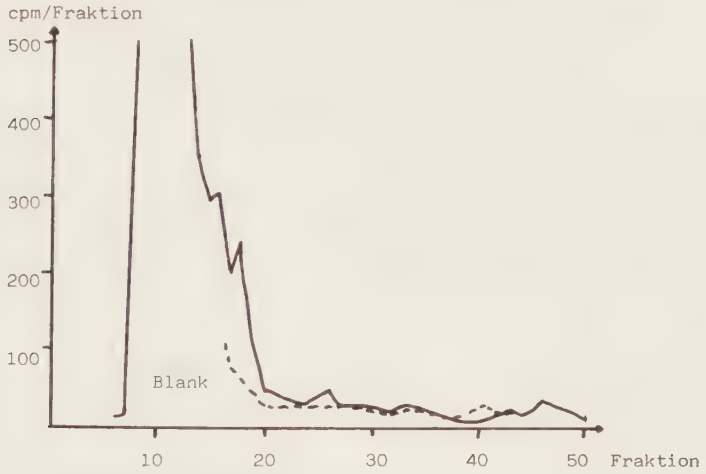


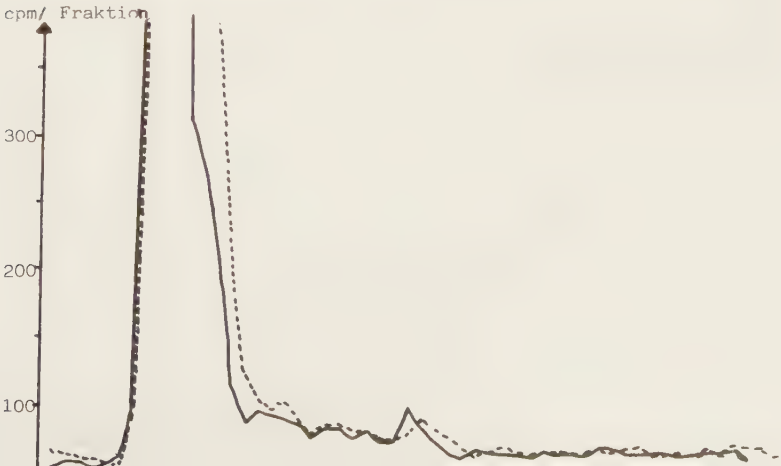
Abb. 19 : Spongiosainkubation mit 1 ml Urämikerserum



6.3. Versuchsgruppe III : Inkubation mit NADH

Bei fünf Spongiosainkubationen mit NADH wurden keinerlei Metabolite des Vitamin D_3 erhalten. Kontrollen und Spongiosainkubationen zeigten einen nahezu identischen Kurvenverlauf (Abbildung 20).

Abb. 20 : Spongiosainkubation mit NADH als Coenzym



Zur besseren Übersicht lassen sich die Ergebnisse aller drei Versuchsgruppen folgendermaßen zusammenfassen (Tabelle 2):

Tabelle 2 : Ergebnisse von 30 Spongiosainkubationen

Spongiosainkubationen	Anzahl	Vitamin D_3-Metabolite		
		Peak II $24,25(OH)_2-D_3$	Peak III $1,25(OH)_2-D_3$	Peak IV trihydroxyliert ?
Versuchsgruppe I (Standard)	2	-	-	-
	9	-	-	-
	4	-	-	-
	6	-	-	-
Versuchsgruppe II (Urämikerserum)	4	-	-	-
Versuchsgruppe III (NADH)	5	-	-	-

7. Diskussion

In dreizehn Inkubationen ließ sich in Peak II ein Metabolit eliminieren, der sich chromatographisch wie $24,25(OH)_2-D_3$ verhält.
In fünfzehn Inkubationen wurde Peak III gefunden, der sich selbst in den unterschiedlichsten Identifizierungsversuchen wie $1,25(OH)_2-D_3$ verhält.
Peak IV trat bei vier Inkubationen auf, und zwar gleichzeitig mit Peak II und III. Die Identifizierung dieses Metaboliten, bei dem es sich möglicherweise um das polarere trihydroxylierte $1,24,25(OH)_3-D_3$ handelt, konnte noch nicht durchgeführt werden.

Bei sechs Inkubationen der Versuchsgruppe I ließen sich keine Metabolite finden. Eine Ursache dafür ist nicht mit Sicherheit anzugeben, wahrscheinlich liegt es an dem unterschiedlichen Patientengut. Die Kranken wiesen als gemeinsames Merkmal lediglich ein erkranktes Hüftgelenk auf, das aufgrund einer Arthrose oder Kopfnekrose durch eine Totalendoprothese ersetzt wurde. Auf andere Erkrankungen, unterschiedliche Durchblutung, teilweise fettig degeneriertes Mark und eventuelle medikamentöse Beeinflussung konnte unmöglich bei der Auswahl der Patienten Rücksicht genommen werden.

Bei Patienten über 76 Jahren wurde auf eine Inkubation verzichtet, da in Anbetracht des Alters mit einer weniger aktiven Spongiosa zu rechnen war.
Bei manchen Hüftköpfen zeigte sich ein unverhältnismäßig hoher Prozentsatz an fettreichem Mark, von dem die darin eingebettete Spongiosa biologisch nicht sehr aktiv zu sein schien.

Geht man davon aus, daß der menschliche Knochen - wie in der vorliegenden Arbeit darzustellen versucht wurde - eventuell in der Lage ist, aus 25 OH-D_3 die hydroxylierten Metabolite $24,25(OH)_2-D_3$ und $1,25(OH)_2-D_3$ zu synthetisieren, muß die Frage geklärt werden, warum bei Patienten

mit chronischer Niereninsuffizienz im Serum kein $1,25(OH)_2-D_3$ gemessen werden kann. Auf der anderen Seite sollten auch sämtliche Personen mit einer lange genug bestehenden Niereninsuffizienz eine nephrogene Osteopathie entwickeln. Das trifft jedoch nicht immer zu.
Die Vermutung liegt nahe, daß die Hydroxylasen der Spongiosa durch ein "Urämietoxin" inhibiert werden. Diese Hemmung könnte sich dann auf die vom Knochen gebildeten Vitamin D_3-Metabolite auswirken und dadurch die unterschiedlich stark ausgeprägten Formen der nephrogenen Osteopathie verursachen.
Eine weitere Folge der unterdrückten Hydroxylierungen könnte auch die bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bekannte Parathormonresistenz des Knochens sein. Die calcämische Eigenschaft des PTH am Knochen wird durch Aufeinanderfolge von biochemischen Schritten erklärt, von denen einer durch cAMP stimuliert wird, und in deren Folge ein oder mehrere Proteine gebildet werden, deren Synthese von $1,25-(OH)_2-D_3$ abhängig ist.

Bei der renalen Hydroxylierung des in der Leber gebildeten $25\ OH-D_3$ ist das Coenzym NADPH erforderlich, das NADH dagegen ineffektiv (72). Unsere fünfmaligen Inkubationen mit NADH konnten dies auch für die menschliche Spongiosa bestätigen.

8. Zusammenfassung

1) Entwicklung einer Methode zur in vitro Untersuchung des Vitamin D_3-Metabolismus in menschlicher Spongiosa.

2) Darstellung der durch Inkubation entstandenen Vitamin D_3-Metaboliten durch Säulen- und Dünnschichtchromatographien, sowie durch Kristallisation zu konstanter, spezifischer Aktivität.

3) Nachweis der Cochromatographie der durch Inkubation mit 25 OH-D_3* entstandenen Vitamin D_3-Metabolite 24,25$(OH)_2$-D_3* und 1,25$(OH)_2$-D_3*.

4) Hemmung der Metabolisierung des Vitamin D_3 in menschlicher Spongiosa durch Zugabe von Urämikerserum.

5) Nachweis der spezifischen Abhängigkeit der Vitamin D_3-Metabolisierung in menschlicher Spongiosa von dem Coenzym NADPH und der Ineffektivität des NADH.

1. Holick,M.F., S.A. Holick, S.M. McNeill, N. Richtand, M.B. Clark, J.T. Potts jr.: The photo-biochemistry of vitamin D_3 in vivo in the skin. In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D. v.Herrath, H.-G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds.), S. 173. Berlin : de Gruyter 1979
2. Kodicek, E.: Metabolic studies on vitamin D. In: Ciba Foundation Symposium on Bone Structure and Metabolism. G.W.E. Wolstenholme, C.M. O'Connor (eds.), S. 161, Boston: Little, Brown and Co 1956
3. Rosenstreich, S.J., C. Rich, W. Volwiler: Deposition in and release of vitamin D_3 from body fat: evidence for a storage site in the rat. J. Clin. Invest. 50, 679 (1971)
4. Avioli, L.V., S.W. Lee, J.E. McDonald, J. Lund, H.F. DeLuca: Metabolism of vitamin D_3-^3H in human subjects: distribution in blood, bile, feces, and urine. J. Clin. Invest. 46, 983 (1967)
5. DeLuca, H.F.: Vitamin D: metabolism and function, S.46, Berlin: Springer 1979
6. Bar, A., R.H. Wassermann: Control of calcium absorption and intestinal calcium-binding protein synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 191 (1973)
7. Wassermann, R.H., A.N. Taylor: Vitamin D-dependent calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. Science 152, 791 (1966)
8. Wassermann,R.H., J.J. Feher: Vitamin D-dependent calcium-binding protein. In: Calcium binding proteins and calcium function. R.H. Wassermann, R.A. Corradino, E. Carafoli, R.H. Kretsinger, D.H. Mac Lennan, S.L. Siegel (eds.), S. 293. North-Holland: Elsevier 1977
9. Arnold, B.M., K. Kovacs, T.M. Murray: Cellular localisation of intestinal calcium-binding protein in pig duodenum. Digestion 14, 77 (1976)
10. Wilson, P.W., D.E.M. Lawson: 1,25-Dihydroxyvitamin D stimulation of specific membrane proteins in chick intestine. Biochem. Biophys. Acta 497, 805 (1977)
11. Haussler, M.R., J.W. Pike, J.S. Chandler, P.G. Jones: Molecular mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D hormone. Sixth International Congress of Endocrinology, Melbourne, Program and abstracts, S. 172 (1980)

11. Haussler, M.R., J.W. Pike, J.S. Chandler, P.G. Jones: Molecular mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D hormone. Sixth International Congress of Endocrinology, Melbourne, Program and abstracts, S. 172 (1980)

12. Zerwekh, J.E., M.R. Haussler, T.J. Lindell: Rapid enhancement of chick intestinal DNA-dependent RNA polymerase II activity by 1α, 25-dihydroxyvitamin D_3, in vivo. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2337 (1974)

13. Spencer, R., M. Charman, J.S. Emtage, D.E.M. Lawson: Production and properties of vitamin-D-induced mRNA for chick calcium-binding protein. Eur. J. Biochem. 71, 399 (1976)

14. Harrison, H.E., H.C. Harrison: Intestinal transport of phosphate: action of vitamin D, calcium, and potassium. Am. J. Physiol. 201, 1007 (1961)

15. Taylor, A.N.: In vitro phosphate transport in chick ileum: effect of cholecalciferol, calcium, sodium and metabolic inhibitors. J. Nutr. 104, 489 (1974)

16. Chen, T.C., L. Castillo, M. Korycka-Dahl, H.F. DeLuca: Role of vitamin D metabolites in phosphate transport of rat intestine. J. Nutr. 104, 1056 (1974)

17. Bonjour, J.-P., H. Fleisch: The effect of vitamin D and its metabolites on the renal handling of phosphate. In: Vitamin D, biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, D. Fraser, H.-G. Grigoleit, D. v.Herrath (eds.), S. 419. Berlin: de Gruyter 1977

18. Sutton, R.A.L., C.A. Harris, N.L.M. Wong, J. Dirks: Effects of vitamin D on renal tubular calcium transport. In: Vitamin D, biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, J.W. Coburn, H,F. DeLuca, D. Fraser, H.-G. Grigoleit, D. v.Herrath (eds.), S. 451. Berlin: de Gruyter 1977

19. Neville, P.F., H.F. DeLuca: The synthesis of (1,2-^{3}H)vitamin D_3 and the tissue localization of a 0,25 µg (10 IU) dose per rat. Biochemistry 5, 2201 (1966)

20. Wezeman, F.H.: 25-Hydroxyvitamin D_3: autoradiographic evidence of sites of action in epiphyseal cartilage and bone. Science 194, 1069 (1976)

20. Wezeman, F.H.: 25-Hydroxyvitamin D_3: autoradiographic evidence of sites of action in epiphyseal cartilage and bone. Science 194, 1069 (1976)

21. Wong, R.G., J.F. Myrtle, H.C. Tsai, A.W. Norman: Studies on calciferol metabolism. V. The occurence and biolcgical activity of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in bone. J. Biol. Chem. 247, 5728 (1972)

22. Lawson, D.E.M., M. Charman, P.W. Wilson, S. Edelstein: Some characteristics of new tissue-binding proteins for metabolites of vitamin D other than 1,25-dihydroxyvitamin D. Biochem. Biophys. Acta 437, 403 (1976)

23. Bingham, P.J., I. Brazell, M. Owen: The effect of parathyroid extract on cellular activity and plasma calcium levels in vivo. J. Endocrinol. 45, 387 (1967)

24. Raisz, L.G., I. Niemann: Effect of phosphate, calcium and magnesium on bone resorption and hormonal response in tissue culture. Endocrinology 85, 446 (1969)

25. Wuthier, R.E.: Zonal analysis of electrolytes in epiphyseal cartilage and bone of normal and rachitic chickens and pigs. Calcif. Tiss. Res. 8, 24 (1971)

26. Baylink, D., M. Stauffer, J. Wergedal, C. Rich: Formation, mineralization, and resorption of bone in vitamin D-deficient rats. J. Clin. Invest. 49, 1122 (1970)

27. Eastwood, J.B., P.J. Bordier, E.M. Clarkson, S. Tun Chot, H.E. De Wardener: The contrasting effects on bone histology of vitamin D and of calcium carbonate in the osteomalacia of chronic renal failure. Clin. Sci. Mol. Med. 47, 23 (1974)

28. Rasmussen, H., P. Bordier: In: The physiological and cellular basis of metabolic bone disease, S. 243. Williams and Wilkins Co.: Baltimore 1974

29. Malluche, H.H., H. Henry, W.A. Meyer, D. Sherman, S.G. Massry, A.W. Norman: Effects and interaction of 1,25-$(OH)_2 D_3$ and 24,25-$(OH)_2 D_3$ on bone. In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D. v.Herrath, H.-G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds.), S. 425. Berlin: de Gruyter 1979

30. Keck, E., H. v.Lilienfeld-Toal, H.L. Krüskemper: Protein binding assays for 25-hydroxycholecalciferol, 24,25-dihydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol in human plasma. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. accepted

31. Eisman, J.A., R.M. Shephard, H.F. DeLuca: Determination of 25-hydroxyvitamin D_2 and 25-hydroxyvitamin D_3 in human plasma using high pressure liquid chromatography. Anal. Biochem. 80, 298 (1977)

32. Arnaud, S.B., M. Matthusen, J.B. Gilkinson, R.S. Goldsmith: Components of 25-hydroxyvitamin D in serum of young children in upper mid-western United States. Am. J. Clin. Nutr. 30, 1082 (1977)

33. Taylor, C.M., E.B. Mawer, J.E. Wallace, J. St. John, M. Cochran, R.G. Russel, J.A. Kanis: The absence of 24,25-dihydroxycholecalciferol in anephric patients. Clin. Sci. Mol. Med. 55, 541 (1978)

34. Kremer, R., S. Guillemant: A simple and specific competitive protein binding assay for 24,25-dihydroxyvitamin D in human serum. Clin. Chem. Acta 86, 187 (1978)

35. Horst, R.L., R.M. Shephard, N.A. Jorgensen, H.F. DeLuca: Assay for vitamin D and its metabolites. In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D. v.Herrath, H.-G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds.), S. 213. Berlin: de Gruyter 1979

36. Bhattacharryya,M.H., H.F. DeLuca: Subcellular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase. Arch. Biochem. Biophys. 160, 58 (1974)

37. Horsting, M., H.F. DeLuca: In vitro production of 25-hydroxycholecalciferol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 251 (1969)

38. Riggs, B.L., J.C. Gallagher, H.F. DeLuca: Osteoporosis and age-related osteopenia: evaluation of possible role of vitamin D endocrine system in pathogenesis of impaired intestinal calcium absorption. In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D. v.Herrath, H.-G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds.), S. 107. Berlin: de Gruyter 1979

39. Gray, R.W., J.L. Omdahl, J.G. Ghazarian, H.F. DeLuca: 25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: subcellular location and properties. J. Biol. Chem. 247, 7528 (1972)

40. Boyle, I.T., R.W. Gray, J.L. Omdahl, H.F. DeLuca: Calcium control of the in vivo biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D_3: Nicolaysen's endogenous factor. In: Endocrinology 1971. Proceedings of the third international symposium. S. Taylor (ed.), London: Heinemann Medical

41. Bar, A., R.H. Wassermann: Control of calcium absorption and intestinal calcium-binding protein synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 191 (1973)

42. Baxter, L.A., H.F. DeLuca: Stimulation of 25-hydroxyvitamin D_3-1α-hydroxylase by phosphate depletion. J. Biol. Chem. 251, 3158 (1976)

43. Ghazarian, J.G., H.F. DeLuca: 25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: a specific requirement for NADPH and a hemoprotein component in chick kidney mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 160, 63 (1974)

44. Fraser, D.R., E. Kodicek: Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. Nature 228, 764 (1970)

45. Boyle, I.T., R.W. Gray, H.F. DeLuca: Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2131 (1971)

46. Galante, L., S.J. MacAuley, K.W. Colston, I. MacIntyre: Effect of parathyroid extract on vitamin D metabolism. Lancet I, 985 (1972)

47. Spencer, E.M., O. Tobiassen, P. Ling, E. Braunstein: Growth hormone and prolactin action on vitamin D metabolism in the rat. In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D. v.Herrath, H.-G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds.), S. 475. Berlin: de Gruyter 1979

48. MacIntyre, I.: Comparative aspects of the biochemistry of the regulation of vitamin D metabolism. In: Vitamin D, biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, D. Fraser, H.-G. Grigoleit, D. v.Herrath (eds), S. 155. Berlin: de Gruyter 1977

49. Holick, M.F., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca, R.W. Gray, I.T. Boyle, T. T. Suda: Isolation and identification of 24,25-dihydroxycholecalciferol: a metabolite of vitamin D_3 made in the kidney. Biochemistry 11, 4251 (1972)

50. Boyle, I.T., J.L. Omdahl, R.W. Gray, H.F. DeLuca: The biological activity and metabolism of 24,25-dihydroxyvitamin D_3. J. Biol. Chem. 248, 4174 (1973)

51. Garabedian, M., M.T. Corvol, M. Bailly du Bois, M. Lieberherr, S. Balsan: The biological activity of 24,25-dihydroxycholecalciferol on cultured chondrocytes and its in vitro production in cartilage and calvarium. In: Proceedings of the sixth parathyroid conference. University of British Columbia, Vancouver, Canada. Abstracts S. 160, 1977

52. Kumar, R., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca: Rat intestinal 25-hydroxyvitamin D_3- and 1α,25-hydroxyvitamin D_3-24-hydroxylase. J. Biol. Chem. 253, 3804 (1978)

53. Keck, E., Roswitha Durdel, H.U. Schweikert, W Meier, Ulrike Hennes, F. Krück, H.L. Krüskemper: Metabolism of 25-hydroxycholecalciferol in human spongiosa. Sixth International Congress of Endocrinology, Melbourne, Program and abstracts, S. 254 (1980)

54. DeLuca, H.F.: Vitamin D metabolism and function. Arch. Intern. Med. 138, 836 (1978)

55. Mawer, E.B.: Aspects of the control of vitamin D metabolism in man. In: Vitamin D, biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism. A.W. Norman, K. Schaefer, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, D. Fraser, H.-G. Grigoleit, D. v.Herrath (eds.), S. 165. Berlin: de Gruyter 1977

56. Suda, T., H.F. DeLuca, H.K. Schnoes, Y. Tanaka, M. Holick: 25,26-Dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D_3 with intestinal calcium transport activity. Biochemistry 9, 4776 (1970)

57. Thomasset, M., J. Redell, P. Marche, P. Cuisinier-Gleizes: 25(R),26- and 25(S),26- $(OH)_2D_3$: biological activity in intact and nephrectomized rats. Comparative effects of 1,25-, 24(R),25-$(OH)_2D_3$ and 1,24(R),25-$(OH)_3D_3$. In: Vitamin D, basic research and its clinical application. A.W. Norman, K. Schaefer, D. v.Herrath, H.-G. Grigoleit, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda (eds.), S.73. Berlin: de Gruyter 1979

58. Holick, M.F., A. Kleiner-Bossaller, H.K. Schnoes, P.M. Kasten, I.T. Boyle, H.F. DeLuca: 1,24,25-Trihydroxyvitamin D_3: a metabolite of vitamin D_3 effective on intestine. J. Biol. Chem. 248, 6691 (1973)

59. Jones, G., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca: Isolation and identification of 1,25-dihydroxyvitamin D_3. Biochemistry 14, 1250 (1975)

60. Jones, G., H.K. Schnoes, H.F. DeLuca: An in vitro study of vitamin D_3 hydroxylases in the chick. J. Biol. Chem. 251, 24 (1976)

61. Jones, G., L.A. Boxter, H.F. DeLuca, H.K. Schnoes: Biological activity of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in the chick. Biochemistry 15, 713 (1976)

62. v. Werder, F.: Über Dihydro-tachysterin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 260, 119 (1939)

63. Suda, T., R.B. Hallick, H.F. DeLuca, H.K. Schnoes: 25-Hydroxydihydrotachysterol$_3$. Synthesis and biological activity. Biochemistry 9, 1651 (1970)

64. Gallagher, J.C., B.L. Riggs, J. Eisman, A. Hamstra, S.B. Arnaud, H.F. DeLuca: Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients. J. Clin. Invest. 64, 729 (1979)

65. Tanaka, Y., L. Castillo, H.F. DeLuca: Control of renal vitamin D hydroxylases in birds by sex hormones. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2701 (1976)

66. Castillo, L., Y. Tanaka, H.F. DeLuca, M.L. Sunde: The stimulation of 25-hydroxyvitamin D_3-1α-hydroxylase by estrogen. Arch. Biochem. Biophys. 179, 211 (1977)

67. Mawer, E.B., J. Bachhouse, L.F. Hill, G.A. Lumb, P. de Silva, C.M. Taylor, S.W. Stanbury: Vitamin D metabolism and parathyroid function in man. Clin. Sci. Molec. Med. 48, 349 (1975)

68. Stanbury, S.W., E.B. Mawer, L.F. Hill, C.M. Taylor, P. de Silva, G.A. Lumb. In: Calcium regulating hormones. R.V. Talmage, M. Owen, J.A. Parsons (eds.), S. 431. Amsterdam: Excerpta Medica 1975

69. Garabedian, M., M. Bailly du Bois, M.T. Corvol, E. Pezant, S. Balsan: Endocrinology 102, 1262 (1978)

70. Luben, R.A., G.L. Wong, V.D. Cohn : Endocrinology 99, 526 (1976)

71. Stanbury, S.W., E.B. Mawer : Physiological aspects of vitamin D metabolism in man. In: Vitamin D. D.E.M. Lawson (ed.), S. 303. Academic Press 1978

72. Holick, M.F., H.F. DeLuca: Metabolism of vitamin D. In : Vitamin D. D.E.M. Lawson (ed.), S. 51. Academic Press 1978

Lebenslauf

22.9.1947	in Opladen geboren
1954-1966	Besuch von Volksschule und Gymnasium in Opladen
3.11.1966	Reifeprüfung an der Ina-Seidel-Schule in Opladen
WS 66/67	Immatrikulation an der Universität zu Köln in der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
16.12.1974	Abschluß des Studiums in Köln als Diplom-Biologin
WS 74/75	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum in der medizinischen Fakultät
27.8.1976	Ärztliche Vorprüfung bestanden
WS 76/77	Immatrikulation an der Universität Düsseldorf zum ersten klinischen Semester in der medizinischen Fakultät
26.8.1977	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden
14.3.1980	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden
zur Zeit	kurz vor dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Düsseldorf, d. 26.3.1981

Meine Adresse :

Roswitha Durdel, An der Robertsburg 13, 5090 Leverkusen 3